

## PROSES BIODEGRADASI MINYAK DIESEL OLEH CAMPURAN BAKTERI PENDEGRADASI HIDROKARBON

### DIESEL OIL BIODEGRADATION PROCESS BY MIXED CULTURE OF HYDROCARBON DEGRADER BACTERIA

Mohamad Yani dan Yusuf Akbar

Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor  
Kampus IPB, Darmaga, Bogor 16680, Telp./Fax. 62-251-8625088  
E-mail : mohyani@ipb.ac.id

#### ABSTRACT

Three isolates name as *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Pseudomonas pseudomallei* (PP) and *Enterobacter agglomerans* (EA) are petroleum hydrocarbon degrader bacteria. They were grown in mineral medium and 10% diesel oil as carbon source. The diesel oil biodegradation by PAEA and PPEA are better than single or other mixed cultures. The diesel oil compounds are oxidized to intermediate product and detected as fatty acids ranged of  $nC_{18}$  to  $nC_8$ , organic acids, and then it was mineralized. The mineralized products measured as methane, carbon dioxide, and carbon monoxide. This result showed that during hydrocarbon biodegradation of aliphatic compounds by those isolates through fatty acids formation, simple organic acids, and simple volatile organic carbon. The mineralized product of methane, carbon dioxide, and carbon monoxide were emitted to the environment.

**Keywords:** Biodegradation, diesel oil, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, minerallized

#### PENDAHULUAN

Kegiatan industri dan transportasi banyak menghasilkan limbah sisa minyak bumi yang mencemari tanah dan perairan. Pencemar paling besar adalah dari kegiatan produksi minyak bumi seperti pengeboran, proses produksi, pengangkutan, dan pengilangan produk minyak. Selama kegiatan ini dapat terjadi tumpahan minyak, secara sengaja maupun tidak sengaja mencemari lingkungan. Cara penanganan yang efektif dan efisien yaitu dengan proses biodegradasi karena proses ini tidak meninggalkan residu, membutuhkan biaya penanganan yang lebih murah, lebih aman dan tidak merusak lingkungan, dibandingkan cara fisik-kimia.

Jenis bakteri lokal (*indigenous bacteria*) dianalisis dari sampel limbah cair perusahaan minyak bumi telah diisolasi dan diidentifikasi terhadap mikroba yang dominan. Jenis mikroba dominan tersebut adalah *Enterobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Shigella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.*, dan *Citrobacter sp.* (Crawford dan crawford, 1996 dan Cookson, 1995).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui proses biodegradasi minyak diesel dengan menggunakan mono atau campuran kombinasi dari tiga isolat bakteri.

#### METODE PENELITIAN

##### Bahan dan Alat

Isolat *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Pseudomonas pseudomallei* (PP) dan *Enterobacter agglomerans* (EA) yang telah diisolasi, diremajakan dengan menggunakan media Luria Bertani (LB) yang dimodifikasi. Dalam 1 liter media tersebut mengandung 10 g bacto trypton, 5 g yeast ekstrak, 5

g NaCl. Biakan berumur 24 jam diuji ulang kemampuan tumbuhnya pada media minimal dan sumber karbon minyak diesel, sampai kemampuan tumbuhnya baik pada konsentrasi 10% (v/v) minyak diesel. Komposisi media minimal per liter mengandung 0,5 g  $K_2HPO_4$ , 1 g  $(NH_4)_2Cl$ , 0,02 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2 g Yeast Ekstrak, 0,1 g *Casamino Acid*, 1 ml unsur kelumit (Campuran dari 0,05 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,002 g  $FeSO_4$ , 0,5 mg/l  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0,2 mg/l  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 0,2 mg/l  $ZnSO_4$ ). Penyiapan kultur bakteri dilakukan dengan media mineral dan minyak diesel 10% hingga akhir phase logaritmik, untuk dilakukan pada pengujian selanjutnya. Total koloni bakteri (*total plate count*) diukur dengan menggunakan media padat LB.

Pengujian kemampuan isolat dalam menggunakan sumber karbon minyak bumi dilakukan pada media padat. Isolat yang ditumbuhkan pada media cair LB berumur 6 jam disebarkan pada media mineral padat, diberi 5 potongan kertas steril yang masing-masing mengandung *crude oil*, pelumas, minyak tanah, diesel dan bensin. Kultur diinkubasi pada suhu 30°C selama 2-3 hari. Pengamatan pertumbuhan koloni bakteri di sekitar kertas mengandung substrat dilakukan secara visual. Bakteri yang mampu tumbuh dan memenuhi lingkaran kertas saring diasumsikan positif, sedang-kan jika ada area bening diasumsikan kesulitan atau tidak dapat menggunakan sumber karbon tersebut.

Pertumbuhan kultur mono dan campuran isolat pada media yang mengandung minyak diesel 10% dilakukan untuk menentukan campuran kultur terbaik. Pengujian dilakukan pada media cair dalam tabung serum 100 ml berisi 17,8 ml media minimal, 2 ml minyak diesel steril dan 0,2 ml isolat. Fermentasi dilakukan pada inkubator goyang 120 putaran per menit pada suhu ruang (25-30°C) selama

4 hari. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengukur perubahan kekeruhan media pada panjang gelombang 600 nm dengan spektrofotometer, setiap hari.

Proses biodegradasi minyak diesel dilakukan terhadap dua kultur pertumbuhan terbaik dengan cara yang sama. Disediakan sejumlah kultur yang akan dipanen pada jam ke 0, 24, 48 dan 72 secara duplo. Ulangan pertama diukur perubahan kekeruhan media setiap hari dengan menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui pertumbuhannya, sedangkan ulangan kedua diinjeksikan 6 tetes natrium nitrit 1% untuk mematikan bakteri. Pengukuran produksi intermediate asam lemak dan produk gas dengan GC model Hitachi 263-50, serta produksi asam organik dengan HPLC Waters model 440, sedangkan konsentrasi C organik dan nitrogen terlarut diukur metoda spektrofotometri.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada umumnya ketiga isolat tersebut mampu mempergunakan tiga jenis substrat minyak yaitu minyak diesel, minyak tanah, dan bensin. Bakteri PP dan PA ternyata dapat tumbuh juga pada *crude oil*, sedangkan bakteri EA dapat menggunakan lima jenis substrat tersebut.

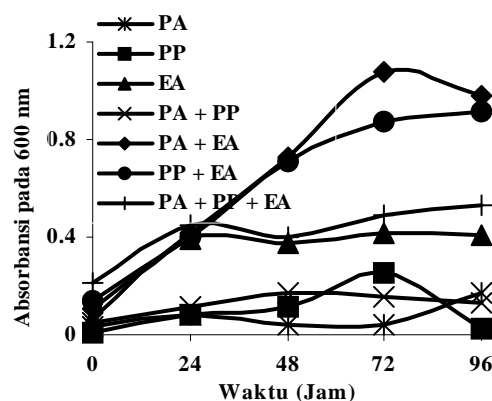
Kemampuan biodegradasi minyak diesel diuji pada media cair. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri mampu tumbuh pada media yang mengandung minyak diesel pada konsentrasi 10 persen minyak diesel selama satu minggu. Pertumbuhan isolat *Enterobacter agglomerans* mampu tumbuh sampai  $4,8 \times 10^{13}$  CFU/ml (cell forming unit/ml), *Pseudomonas aeruginosa*  $5,6 \times 10^{13}$  CFU/ml dan *Pseudomonas pseudomallei*  $1,2 \times 10^{11}$  CFU/ml.

Perkembangan pertumbuhan isolat diamati secara visual melalui perubahan media. Minyak diesel yang semula menyatu dan membentuk lapisan tersendiri dipermukaan larutan media lama kelamaan terpecah menjadi butiran-butiran yang lebih kecil. Terbentuknya butiran-butiran kecil itu disebabkan oleh adanya produksi biosurfaktan oleh bakteri. Leahly dan Colwell (1990), mengemukakan bahwa sebagian bakteri pendegradasi hidrokarbon diketahui memiliki kemampuan untuk memproduksi biosurfaktan. *Pseudomonas aeruginosa* diketahui memproduksi rhamnolipid pada  $C_{12}$  n-alkana sebagai biosurfaktan (Robert *et al.*, 1989). Hasilnya menunjukkan bahwa kelarutan pada media semakin meningkat setelah 48 jam terutama pada kombinasi PPEA dan PAEA.

Peningkatan kelarutan tersebut disebabkan oleh enzim *membrane-bound oxygenase* yang dikeluarkan oleh bakteri untuk meningkatkan kontak secara langsung antara minyak dengan bakteri, sehingga bakteri dapat memanfaatkan minyak tersebut sebagai sumber karbon. Pada media terjadi perubahan kekeruhan akibat dari biodegradasi minyak diesel dan pertumbuhan sel. Larutan media

minimal untuk minyak bumi yang bening lama kelamaan berubah menjadi keruh. Sementara itu minyak diesel yang mula-mula menyatu dan membentuk lapisan tersendiri dipermukaan larutan media lama-kelamaan terpecah menjadi butiran-butiran yang lebih kecil. Secara umum struktur dari biosurfaktan termasuk bagian dari hidrophilik yang terdiri dari asam amino atau peptida, anion atau kation, mono, di, atau polisakarida. (Georgiou *et al.*, 1992). Struktur biosurfaktan juga terdiri dari amophilik atau hidrophilik peptida (Morkes, 1993). Beberapa biosurfaktan juga mampu melarutkan air seperti glukosa, sukrosa, gliserol atau ethanol (Banat, 1994).

Pengamatan pertumbuhan sel pada media dilakukan pengukuran densitas sel menunjukkan pertumbuhan *Pseudomonas pseudomallei* + *Enterobacter agglomerans* (PPEA) dan *Pseudomonas aeruginosa* + *Enterobacter agglomerans* (PAEA) paling baik dibandingkan dengan yang lainnya (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi PPEA dan PAEA sinergis. Asosiasi sinergis memberikan kemampuan pada kombinasi populasi mikroba untuk melakukan sintesa suatu produk yang tidak bisa dilakukan sendiri (Atlas dan Bartha, 1981).

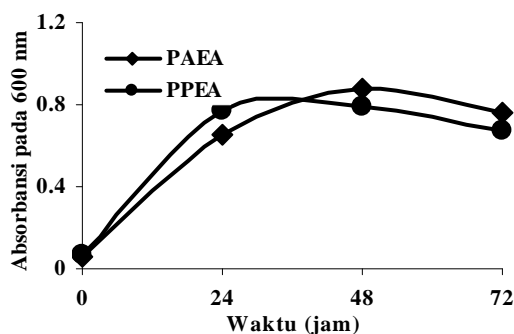


Gambar1. Perubahan kekeruhan media pada pertumbuhan kultur isolat (PA, PP, EA) dan kombinasinya (PA+PP, PA+EA, PP+EA, PP+PA+EA) pada media mineral-minyak diesel (10%)

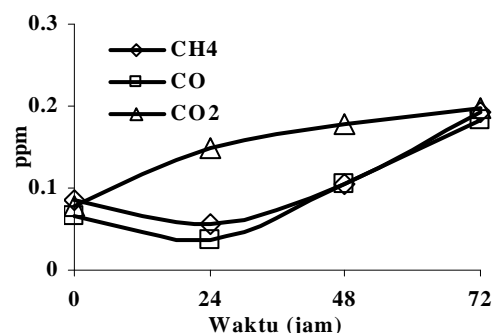
Pengujian proses biodegradasi pada kombinasi terbaik dilakukan dengan mengukur densitas sel, kandungan gas, asam lemak, protein, karbon organik dan asam organik. Pada pengukuran densitas sel yang dilakukan pada media minimal untuk minyak bumi yang mengandung 10% (v/v) minyak diesel menunjukkan pertumbuhan sampai 72 jam pada kedua kombinasi isolat tersebut (Gambar 2).

Produksi gas karbon rendah ( $CH_4$ ,  $CO$ , dan  $CO_2$ ) menunjukkan proses metabolisme yang dilakukan bakteri dalam mendegradasi minyak diesel telah termineralisasi sempurna. Selama proses biodegradasi sebagian besar berlangsung secara

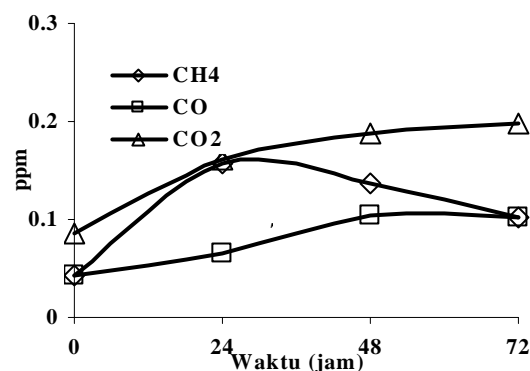
aerob dengan ditunjukkan terbentuknya gas  $\text{CO}_2$  karena dalam pemecahan minyak diesel diperlukan oksigen untuk memproduksi enzim oksigenase yang akhirnya menghasilkan gas  $\text{CO}_2$  (Gambar 3 dan 4). Selain terjadi proses aerob terjadi pula proses anaerob dengan dihasilkannya gas  $\text{CH}_4$  dan  $\text{CO}$ . Proses ini terjadi akibat semakin berkurangnya oksigen. Dengan habisnya oksigen, metabolisme akan dilanjutkan dengan proses denitrifikasi, fermentasi, sulfat reduksi dan metanogenik (Cookson, 1995).



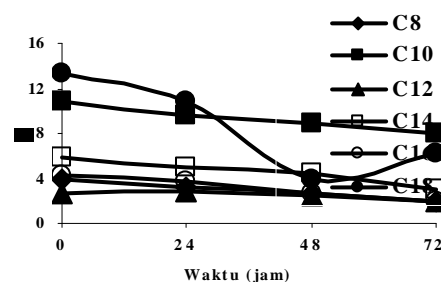
Gambar 2. Perubahan kekeruhan media pada pertumbuhan kultur campuran PAEA dan PPEA pada media mineral-minyak diesel 10%



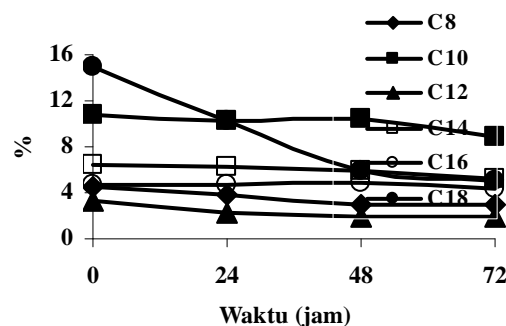
Gambar 3. Produksi gas volatil organik karbon ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}$ , dan  $\text{CO}_2$ ) pada proses biodegradasi minyak diesel oleh kultur campuran PPEA



Gambar 4. Produksi gas volatil organik karbon ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}$ , dan  $\text{CO}_2$ ) pada proses biodegradasi minyak diesel oleh kultur campuran PAEA.



Gambar 5. Perubahan produk intermediate asam lemak  $\text{C}_{18} - \text{C}_8$  yang terukur pada media pada proses biodegradasi minyak diesel oleh kultur campuran PPEA

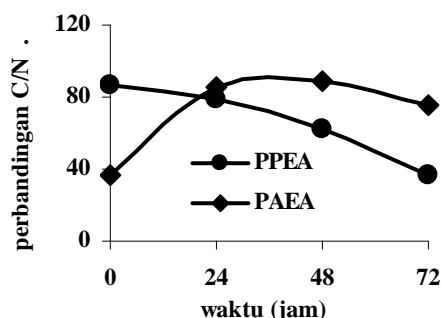


Gambar 6. Perubahan produk intermediate asam lemak  $\text{C}_{18} - \text{C}_8$  yang terukur pada media pada proses biodegradasi minyak diesel oleh kultur campuran PAEA

Dalam degradasi n-alkana pada reaksi oksidasi mula-mula akan terjadi penambahan oksigen pada terminal karbon dari hidrokarbon membentuk alkohol primer. Pada tahap ini diperlukan oksigen dan enzim oksigenase. Kemudian oksidasi dilanjutkan terhadap alkohol primer sehingga terbentuk aldehid menghasilkan asam lemak dan asetil-CoA yang berasal dari potongan dua karbon rantai karbon alkana. Produk antara asetil-CoA akan masuk dalam siklus metabolisme sentral yaitu siklus Krebs. Dari kegiatan ini rantai karbon alkana akan berkurang dari  $\text{C}_n$  menjadi  $\text{C}_{n-2}$ . Kegiatan ini akan berlangsung sampai semua hidrokarbon teroksidasi/mineralisasi. Apabila suatu senyawa organik telah terdegradasi sampai ke bentuk asamnya, reaksi degradasi selanjutnya akan berlangsung melalui pemisahan dua unit karbon secara berkesinambungan. Reaksi tersebut merupakan reaksi yang umum pada metabolisme sel hidup dan dikenal dengan sekuen beta oksidasi (Cookson, 1995).

Nilai rasio C/N menunjukkan seberapa besar perbandingan ketersediaan karbon dan nitrogen dalam media. Penurunan kandungan karbon dalam media menunjukkan tingkat penghilangan yang termineralisasi oleh aktivitas bakteri. Dari hasil pengamatan terlihat penurunan rasio C/N pada PPEA lebih tinggi dibandingkan dengan PAEA yang

disebabkan oleh semakin berkurangnya jumlah karbon (Gambar 7). Produksi gas (Gambar 4) dari PPEA lebih tinggi dibandingkan dengan PAEA (Gambar 5).

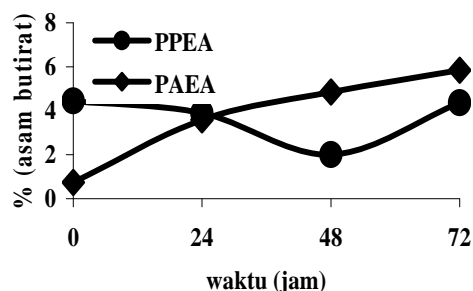


Gambar 7. Perubahan rasio C/N dalam media campuran PPEA dan PAEA pada proses biodegradasi minyak diesel

Berdasarkan hasil pengujian tersebut kombinasi PPEA dan PAEA mempunyai kemampuan mendegradasi minyak diesel yang lebih baik dibandingkan dengan isolat tunggalnya.

Pada analisa asam organik, ternyata produksi asam butirat yang bersifat volatil lebih dominan dibandingkan dengan asam organik lainnya (asam-asam propionat, oksalat, asetat, dan formiat). Terbentuknya asam-asam organik ini disebabkan terjadinya pemecahan hidrokarbon rantai pendek. Menurut Cookson (1995) rantai pendek lebih sulit didegradasi kecuali metana. Untuk mendegradasi rantai pendek tersebut mempergunakan metana sebagai *primary substrat* dan mengoksidasi etana, propana, butana sebagai *secondary substrat* membentuk alkohol, aldehid dan asam karboksilat. Sedangkan jenis asam-asam organik lain yang tidak terdeteksi disebabkan terjadinya proses penguapan pada asam-asam organik rendah.

Kandungan asam butirat dalam media PAEA meningkat dalam 72 jam, sedangkan pada PPEA relatif stabil (Gambar 8). Campuran isolate PPEA diduga lebih mampu merubah asam-asam organik menjadi produk mineralisasi dalam bentuk gas (Gambar 5) sedangkan PAEA lebih rendah (Gambar 6).



Gambar 8. Perubahan kandungan asam butirat selama proses biodegradasi minyak diesel oleh campuran bakteri PPEA dan PAEA.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pseudomallei* dan *Enterobacter agglomerans*, mampu menggunakan sumber karbon dari beberapa jenis minyak bumi. Berdasarkan aktifitasnya dalam mendegradasi hidrokarbon minyak diesel, kombinasi isolat bakteri lebih baik mendegradasi hidrokarbon minyak diesel dibandingkan dengan isolat tunggalnya. Kombinasi campuran isolat terbaik yang diperoleh adalah PAEA (*Pseudomonas aeruginosa* + *Enterobacter agglomerans*) dan PPEA (*Pseudomonas pseudomallei* + *Enterobacter agglomerans*). Kombinasi PAEA dan PPEA mampu mendegradasi hidrokarbon minyak diesel menjadi asam lemak ( $C_{18}$  sampai  $C_8$ ), asam organik yang didominasi oleh asam butirat, dan hasil mineralisasi berupa  $CO_2$ ,  $CH_4$  dan  $CO$ . Produk mineralisasi campuran PPEA lebih baik dibandingkan PAEA.

### Saran

Pengembangan starter dari tanah atau air tercemar minyak bumi dapat dilakukan dengan menggunakan pengayaan media dengan sumber karbon minyak diesel, yang akan didominasi oleh bakteri *Pseudomonas sp.* dan *Enterobacter sp.* Proses biodegradasi minyak bumi (diesel) dalam teknik bioremediasi menghasilkan produk gas karbon yang perlu diteliti lebih jauh sebagai penghasil gas rumah kaca.

## DAFTAR PUSTAKA

- Atlas R.M. and R. Bartha. 1981. Microbial ecology: Fundamentals and applications. Addison-Wesley Publishing Company Inc.
- Banat M.I. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology* 51: 1-12.
- Cookson J.T. 1995. Bioremediation engineering: Design and application. McGraw-Hill Inc., Toronto.
- Crawford R.L. dan D.L. Crawford. 1996. Bioremediation principles and applications. Cambridge University Press, Cambridge.
- Georgiou G., S. Lin, and M.M. Sharma. (1992). Surface active compounds from microorganisms. *Bioresource Technology* 10: 60-5.
- Leahy J.G. dan R.R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Departement of Microbiology, University of Maryland, College Park, Maryland pp. 305 – 315.
- Morkes J. 1993. Oil spills-whose thechnology will clean up. *Biotechnology & Bioengineering* 74:255-261.

Robert M., M.E. Mercade, M.P. Bosch, J.L. Parra, M.J. Espuny, M.A. Manresa dan J. Guinea. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotech. Lett.* 11:871-874.